

OZOILE

Induttore biologico

PIÙ DEL FARMACO SENZA FARMACO

Elimina l'infiammazione e rigenera il tessuto



molecules



Articolo

Effetto antinfiammatorio e di rigenerazione tissutale del trattamento topico con Ozoile (Ozonidi stabili con Vitamina E acetato) nella Balanite Xerotica Obliterante

Monica Currò ^{1,†}, Tiziana Russo ^{2,†}, Nadia Ferlazzo ¹, Daniela Caccamo ¹, Pietro Antonuccio ², Salvatore Arena ^{2, ID}, Saveria Parisi ², Patrizia Perrone ², Riccardo Ientile ^{1,*}, Carmelo Romeo ² and Pietro Impellizzeri ^{2, ID}

¹ Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Via Consolare Valeria, 98123 Messina, Italy; moncurro@unime.it (M.C.); nadiaferlazzo@email.it (N.F.); dcaccamo@unime.it (D.C.)

² Department of Human Pathology of Adult and Childhood "Gaetano Barresi", University of Messina, Via Consolare Valeria, 98123 Messina, Italy; russotiziana82@gmail.com (T.R.); pantonuccio@unime.it (P.A.); salvatore.arena@gmail.com (S.A.); parisi.saveria@libero.it (S.P.); perronepatriziaa@gmail.com (P.P.); romeoc@unime.it (C.R.); impellizzerip@unime.it (P.I.)

* Correspondence: ientile@unime.it; Tel.: +39-090-221-3383

† These authors contributed equally to this study.

Ricevuto: 30 Gennaio 2018; Accettato: 11 Marzo 2018; Pubblicato: 13 Marzo 2018

Abstract:

Balanitis xerotica obliterans (BXO) è una malattia cronica infiammatoria della pelle, considerata la variante genitale maschile del lichen sclerosus. I farmaci antiinfiammatori sono comunemente usati nel trattamento della BXO. In questo studio abbiamo valutato gli effetti del trattamento con una formulazione innovativa a base di olio d'oliva ozonizzato con vitamina E acetato (OZOILE) sullo stato infiammatorio e sulla rigenerazione tissutale in pazienti affetti da BXO. I trascritti di proteine coinvolte nell'infiammazione o nella dinamica della rigenerazione tissutale sono stati analizzati mediante PCR. I pazienti affetti da BXO sono stati trattati con crema OZOILE per 7 giorni prima della circoncisione. Abbiamo trovato una significativa riduzione dei livelli di mRNA di IL-1 β , TNF- α , INF- γ , transglutaminasi 2 e NOS2 nei prepuzi trattati con OZOILE rispetto a quelli non trattati ($p < 0,001$). Non sono state osservate differenze significative nell'attivazione di NF- κ B nei campioni ottenuti da pazienti trattati e non trattati. Inoltre, il trattamento con OZOILE ha incrementato l'espressione del fattore ipossia-inducibile (HIF) -1 α , del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e dell'espressione del gene E-caderina ($p < 0,001$). Il trattamento con OZOILE ha mostrato risultati efficaci con riduzione del processo infiammatorio e stimolazione di meccanismi per la rigenerazione tissutale in pazienti affetti da BXO. Potrebbe essere utile uno studio clinico randomizzato su bambini affetti da BXO per verificare l'efficacia del trattamento topico con OZOILE rispetto ai comuni trattamenti topici.

Introduzione

La BXO rappresenta la forma genitale del LSA nei maschi, ed è una malattia infiammatoria cronica ad eziologia sconosciuta che può interessare il prepuzio, il glande, il frenulo, il meato o l'uretra.[1, 2]. Il termine descrive la posizione anatomica, l'aspetto clinico e lo spettro istologico associati alle malattie [1,2].Descritta per primo da Sthumer [3] come un fenomeno post-circoncisione, la BXO rappresenta la causa più comune di fimosi acquisita in età pediatrica(80-90%) [4]. La circoncisione può essere curativa se la malattia è confinata al prepuzio o al glande. Le complicanze vanno dal 2 al 40% e comprendono la stenosi del meato e dell'uretra . Inoltre la malattia può essere associata a trasformazione neoplastica.

LA BXO può essere diagnosticata clinicamente si presenta con aree discromatiche bianco-grigiastre, cicatrici sclerotiche simili a porcellana sulla porzione distale del prepuzio e sul glande che può apparire completamente coperto da uno strato corneo biancastro, di colorito madreperlaceo e consistenza pergamenacea [4]. Sebbene la BXO possa essere rilevata clinicamente, la diagnosi si basa sull'esame istopatologico. L'eziologia non è chiara, si ritiene sia causata da alterazioni dell' autoimmunità sia umorale che cellulare, ed è stata associata con quadri di atopia e altre malattie autoimmuni [4,1].

La circoncisione è considerata il trattamento di scelta, ma può essere praticata la terapia topica sia prima che dopo il trattamento chirurgico [6]. Le linee guida della British Association of Dermatologist raccomandano il trattamento dei bambini affetti da BXO con un corticosteroide ad alte dosi [7].

Una meta-analisi di studi randomizzati condotti sia sugli adulti che sui bambini ha dimostrato che il clobetasolo propionato rappresenta lo steroide più efficace nel trattamento della BXO sia in termini di riduzione della sintomatologia che dello stato infiammatorio, inoltre sembra che esso sia in grado di indurre la remissione clinica. [8]Uno studio Cochrane ha confermato l' efficacia negli adulti, ma non vi sono dati sufficienti per formulare le stesse raccomandazioni nel trattamento in età pediatrica [9]

Inoltre, il clobetasolo propionato può avere diversi effetti collaterali, come atrofia cutanea, ipopigmentazione, lesioni da contatto e infezioni locali da funghi. Pertanto, alcuni studi hanno valutato l'efficacia di altri farmaci rispetto al clobetasolo propionato.

Una crema con testosterone e idrotosterone ha mostrato un'efficacia inferiore rispetto al clobetasolo propionato [8]. Goldstein et al. [10] hanno valutato la risposta alla crema di pimecrolimus, un inibitore della calcineurina che inibisce la proliferazione delle cellule T dopo stimolazione di antigeni specifici e non specifici, mostrandosi però meno efficace rispetto al clobetasolo propionato.

Per quasi 40 anni, l'ozono, un gas altamente instabile con una forte capacità ossidante, è stato utilizzato per le cure mediche. Gli effetti dell'ozono sono stati ampiamente studiati; in particolare, la sua forte capacità ossidante è stata testata per verificarne le proprietà disinfettanti e sanificanti [11-13].

Gli ozonidi sono una classe di composti chimici in cui l'ozono è stabilizzato dalla reazione con acidi grassi insaturi degli oli. Gli ozonidi rappresentano un'alternativa alla terapia farmacologica [14] e sono stati usati come formulazione topica con proprietà germicide [15,16]. È stato riportato che l'olio di oliva ozonizzato non è tossico, accelera la guarigione delle ferite ed esercita effetti antiinfiammatori [14]. In particolare, a contatto con pelle e mucose, l'olio d'oliva ozonizzato, in ambienti caratterizzati da un aumento protonico, come tessuti ischemici, ipossici o danneggiati, rilascia ossigeno molecolare guidando la produzione di specie radicaliche con generazione di stress ossidativo moderato. Questi effetti promuovono la liberazione dei fattori di crescita, l'attivazione dei meccanismi antiossidanti locali e la riparazione dei tessuti [14,17]. Ad oggi, alcuni studi hanno dimostrato l'uso terapeutico dell'olio ozonizzato sulla malattia cutanee [18]. Recentemente, una

nuova crema a base di olio d'oliva ozonizzato con vitamina E acetato (OZOILE), ottenuta dalla gassificazione di olio d'oliva biologico con ozono, è stata proposta per il trattamento delle malattie della mucosa e del processo di guarigione della pelle. In questo studio osservazionale condotto su bambini maschi affetti da BXO, per la prima volta abbiamo valutato gli effetti benefici del trattamento topico con la crema OZOILE, in termini di azione antiinfiammatoria e rigenerazione tissutale.

Risultati

I campioni di prepuzio ottenuti dai pazienti con BXO trattati con OZOILE sono stati esaminati per i livelli di mRNA di diversi marcatori di infiammazione.

Abbiamo trovato una significativa riduzione delle citochine proinfiammatorie nei tessuti del prepuzio dai pazienti BXO trattati con OZOILE rispetto ai pazienti non trattati. In particolare, i livelli di mRNA di tutte le citochine proinfiammatorie testate, come TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , sono diminuiti nei tessuti trattati con OZOILE rispetto a quelli non trattati ($p < 0,001$) (Figura 1).

L'analisi mediante PCR ha rivelato una riduzione significativa (~ 90%) nei livelli di trascrizione del TG2 in pazienti trattati con OZOILE rispetto a soggetti non trattati ($p < 0,001$) (Figura 2A).

Allo stesso modo l'espressione di NOS2 si è significativamente ridotta di circa l'80% nei tessuti trattati con OZOILE rispetto ai non trattati ($p < 0,001$) (Figura 2B).

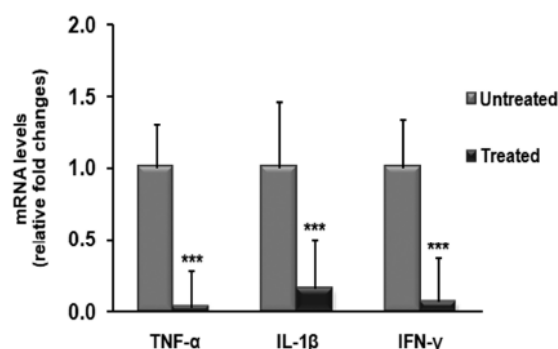


Figura 1. Cambiamenti nei livelli di mRNA di citochine nei tessuti del prepuzio di pazienti affetti da balanite xerotica obliterante (BXO) non trattati o trattati con OZOILE. I risultati ottenuti sono relativi ai dati acquisiti da 15 pazienti non trattati e 15 pazienti trattati. I margini di errore rappresentano l'errore standard della media (SEM).

*** $p < 0,001$ differenze significative rispetto ai pazienti non trattati.

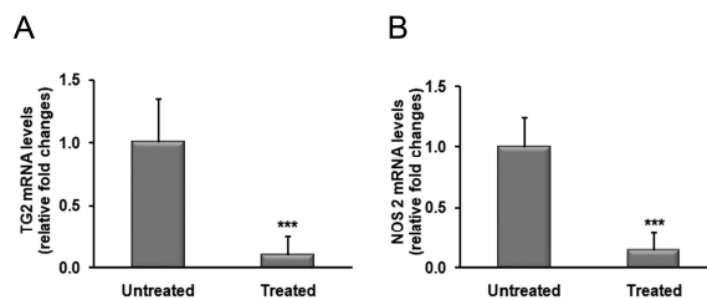


Figura 2. Livelli di trascrizione di TG2 (A) e NOS2 (B) nei tessuti del prepuzio di pazienti affetti da BXO non trattati o trattati con OZOILE. I risultati della PCR real time sono espressi come variazione relativa della curva

rispetto al prepuzio dei pazienti non trattati. I margini di errore rappresentano l'errore standard della media (SEM).
*** $p < 0,001$ differenze significative rispetto ai pazienti non trattati.

Per una comprensione più profonda dei meccanismi molecolari che sottolineano l'azione antiinfiammatoria della crema OZOILE, abbiamo analizzato anche lo stato di attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B mediante il test elettroforetico di spostamento della mobilità (EMSA). Come mostrato nella Figura 3, non abbiamo trovato differenze significative nei livelli di attivazione di NF- κ B tra tessuti trattati e non trattati.

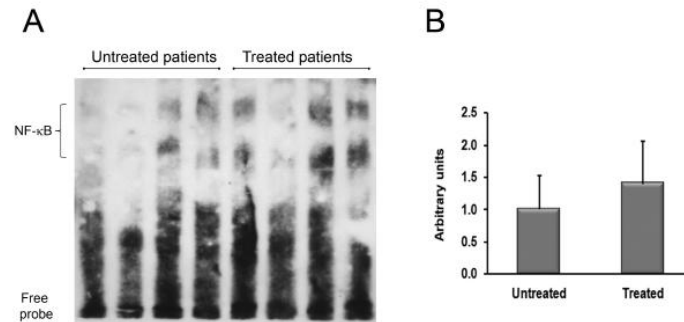


Figura 3. Analisi dell'attivazione di NF- κ B in estratti nucleari da prepuzi di pazienti affetti da BXO non trattati o trattati con OZOILE. L'attività di legame al DNA di NF- κ B è stata determinata dalla tecnica EMSA. Questa immagine è rappresentativa dei tessuti del prepuzio dei pazienti non trattati ($n = 15$) e trattati ($n = 15$). Viene anche riportata l'analisi densitometrica di tutti i campioni. I risultati sono espressi come SEM medio.

Abbiamo anche analizzato i livelli di trascritto di VEGF dimostrando un aumento di VEGF nei prepuzi dei pazienti trattati rispetto a quelli dei pazienti non trattati. In particolare, i livelli di mRNA di VEGF erano 17 volte più alti nei pazienti affetti da BXO trattati con OZOILE rispetto a quelli non trattati ($p < 0,001$) (Figura 4A). È stato anche valutato il possibile coinvolgimento di HIF-1 α nella risposta tissutale a OZOILE, e i risultati hanno mostrato un aumento di 21 volte nelle quantità dei trascritti di HIF-1 α nei prepuzi trattati rispetto ai tessuti non trattati ($p < 0,001$) (Figura 4B).

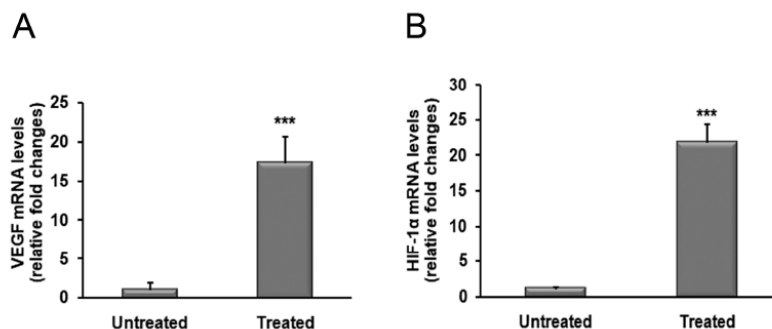


Figura 4. Modifiche nei livelli di mRNA di VEGF e HIF-1 α nei tessuti del prepuzio di pazienti affetti da BXO non trattati o trattati con OZOILE. I risultati ottenuti sono relativi ai dati acquisiti da 15 pazienti non trattati e 15 pazienti trattati. I margini di errore rappresentano l'errore standard della media (SEM).
*** $p < 0,001$ differenze significative rispetto ai pazienti non trattati.

Inoltre, i risultati ottenuti dai livelli di espressione della E-caderina hanno dimostrato che il trattamento con OZOILE induce un aumento della trascrizione dell'E-caderina di 8 volte rispetto ai non trattati ($p < 0,001$) (Figura 5).

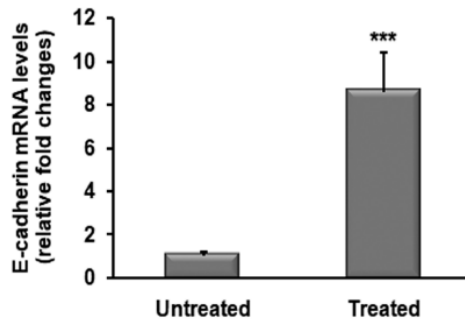


Figura 5. Analisi dei livelli di espressione di E-caderina nei prepuzi di pazienti affetti da BXO non trattati (n = 15) o trattato (n = 15) con OZOILE. I risultati della PCR real time sono espressi come variazione relativa della curva rispetto al prepuzio dei pazienti non trattati. I margini di errore rappresentano l'errore standard della media (SEM). *** p <0,001 differenze significative rispetto ai pazienti non trattati.

Discussione

La BXO è una malattia infiammatoria cronica mediata dai linfociti, ed è una delle potenziali cause di fimosi acquisita durante l'infanzia i cui meccanismi di iniziazione e progressione rimangono in gran parte sconosciuti.

Diversi studi si sono concentrati sulle alterazioni delle vie molecolari sia sul prepuzio che sulla vulva dei pazienti adulti affetti da LSA ma pochi studi sono stati effettuati sui bambini. E' stata segnalata una frequente associazione con le malattie autoimmuni, le malattie della tiroide, l' alopecia areata, la vitiligine e l' anemia perniciosa [8,5]. Gli studi di Previus hanno dimostrato un'associazione con il rischio di malattie gastrointestinali, come la colite ulcerosa, il morbo di Crohn, la stitichezza cronica, la sindrome dell'intestino irritabile, [19] e la malattia celiaca [20,21].

Studi su adulti hanno mostrato un'aumentata incidenza di autoanticorpi contro la proteina 1 della matrice extracellulare, una glicoproteina che svolge un ruolo importante nella biologia strutturale e funzionale della pelle [22]. Oltre all'autoimmunità, sono state pubblicate prove che suggeriscono un legame genetico e casi di lichen sclerosus familiare [23], nonché un'associazione con diversi sottotipi di HLA [24]. Studi precedenti, finalizzati alla caratterizzazione dei processi patogeni di BXO, hanno mostrato un aumento nell'espressione di geni coinvolti nelle risposte immunitarie della difesa cellulare [23] e nei processi proinfiammatori e una riduzione delle proteine essenziali per il rimodellamento tissutale [25] nei tessuti di pazienti con BXO rispetto ai tessuti sani. Nel nostro studio precedente abbiamo dimostrato, nei bambini maschi con BXO, l'attivazione della risposta infiammatoria caratterizzata da aumenti nell'espressione di TG2 e IFN- γ . Inoltre, alterazioni dell'integrità del prepuzio sono state evidenziate dalla riduzione dell'espressione della transglutaminasi 1 (TG1), della transglutaminasi 3 (TG3) e dell'E-caderina [26]. La diagnosi precoce e il trattamento riducono il rischio di recidiva e il coinvolgimento del meato e dell' uretra [5]. La stenosi del meato può anche causare l'ostruzione delle vie urinarie [8]. Gli obiettivi del trattamento con BXO sono l'alleviamento di sintomi e disagio e la prevenzione della stenosi del meato e /o dell'uretra. Il trattamento raccomandato è la circoncisione. Il trattamento medico può essere considerato aggiuntivo rispetto alla circoncisione e utilizzato dopo l'intervento per prevenire o ridurre le complicanze

In età pediatrica, uno studio su 36 pazienti affette da LSA, trattate con corticosteroidi ad alte dosi, ha mostrato che il 75% dei pazienti aveva completa remissione dopo il trattamento e solo il 25% presentava una risposta parziale al trattamento, mentre uno studio su 40 bambini maschi affetti da LSA ha mostrato miglioramento clinico del 40% [27,28]

Sulla base di diversi studi sul trattamento topico, una linea guida britannica raccomanda il trattamento iniziale di ragazzi con BXO con clobetasolo propionato, un corticosteroide molto potente [7].

L'uso di steroidi topici arresta o ritarda la progressione di BXO ed è in grado di invertire alcuni dei cambiamenti istologici osservati nella malattia [28,29].

È stato riportato in letteratura che un trattamento con clobetasolo propionato (0,05%) da due a tre mesi ha successo in oltre il 90% dei casi [30].

L'ozono terapia rappresenta un trattamento versatile in cui tale sostanza viene somministrata o tramite gas o disciolta in acqua o in olio per ottenere effetti terapeutici. Il trattamento è caratterizzato da eccellenti risultati, semplice applicazione, effetti a lungo termine e natura non tossica [12,14].

L'attività terapeutica dell'olio ozonizzato è stata attribuita ai suoi effetti antibatterici, antifungini, antivirali, antiparassitari, antiipossici, analgesici e immunomodulatori sui sistemi biologici [12,13,17]. Inoltre, il fenomeno di una guarigione delle ferite dopo l'ozonoterapia è stata correlata ai rapidi cambiamenti che tale trattamento provoca nei tipi di cellule e al rilascio di citochine che modulano il complesso processo di guarigione [17,31].

Patel e collaboratori hanno dimostrato un miglioramento significativo dei parametri microbiologici e clinici nei pazienti con parodontite trattati con olio d'oliva ozonizzato rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, in un altro studio è stato osservato un miglioramento dei quadri flogistici confermato anche all'esame istologico, nonché una riduzione dell'ulcerazione superficiale sugli esiti della rimozione di grandi lesioni gengivali esofitiche dopo il trattamento chirurgico [17,18,31].

OZOILE è stato utilizzato per il trattamento di sia nel trattamento delle lesioni delle mucose che nei processi di cicatrizzazione della pelle.

È stato dimostrato che OZOILE agisce come induttore biologico in grado di modulare le principali vie metaboliche determinando le risposte cellulari e tissutali e ripristinando le funzioni danneggiate. Studi sull'azione di OZOILE hanno mostrato inoltre attività antinfiammatoria e analgesica [12,32].

Nel nostro studio precedente è stato dimostrato un aumento dei livelli di espressione di TG2 nei tessuti del prepuzio ottenuti da pazienti affetti da BXO rispetto a quelli senza diagnosi di BXO. Inoltre, i livelli di mRNA di IFN- γ erano aumentati in questi rispetto ai non affetti mostrando una correlazione positiva con i trascritti di TG2. Questi risultati hanno suggerito che queste proteine possono svolgere un ruolo nell'indurre e mantenere la risposta infiammatoria nei prepuzi colpiti da BXO [26].

Nel presente studio abbiamo studiato i livelli di espressione di TG2 dopo trattamento con OZOILE, questi appaiono ridotti supportando il ruolo antiinfiammatorio del trattamento nel prepuzio affetto da BXO.

Per quanto riguarda le attività antiinfiammatorie, abbiamo anche osservato una riduzione dei livelli di mRNA di NOS2 dopo il trattamento.

La NOS2, che è l'isoforma indipendente dal calcio della famiglia NOS, produce ossido nitrico (NO), un messaggero intercellulare coinvolto in una vasta gamma di funzioni fisiologiche, in particolare nel controllo della pressione sanguigna e del flusso sanguigno [35,36].

Tuttavia, un aumento della sintesi di NO è solitamente associato allo sviluppo di condizioni patologiche [37]. Infatti, l'NO può reagire rapidamente con altri radicali liberi come l'O₂-• per generare perossinitrito (ONOO-) altamente reattivo e produrre specie reattive dell'ossigeno (RNS), che viene considerato uno dei responsabili dell'infiammazione polmonare cronica. L'espressione NOS2 è generalmente limitata, ma può essere rapidamente indotta da una varietà di stimoli, come le citochine. Quindi, crediamo che il trattamento con OZOILE del prepuzio affetto da BXO, riducendo la produzione di citochine, possa portare alla diminuzione della trascrizione NOS2, esercitando anche effetti benefici contro lo stress nitrosattivo.

Considerando che l'espressione sia delle citochine sia del TG2 è sotto il controllo di NF-κB, un importante fattore che influenza la modulazione della risposta infiammatoria [38], abbiamo ipotizzato che il trattamento con OZOILE potrebbe comportare effetti antiinfiammatori inibendo anche l'NF-κB.

Per sostenere questa ipotesi, abbiamo provato lo stato di attivazione di NF-κB in campioni di tessuto affetto da BXO e trattati con OZOILE confrontati con campioni non trattati. Sorprendentemente, l'analisi dell'EMSA non ha visto una sostanziale modifica all'attività

Questo non sembra essere d'accordo con quanto sopra, ma bisogna considerare che NF-κB non è attivato soltanto dall'attivazione delle citochine [39].

Possibile il coinvolgimento di altri elementi come i livelli di IKK e cGMP. È stato riportato inoltre che la risposta infiammatoria nei pazienti con BXO è associata alla perdita dell'integrità strutturale del prepuzio [26]. Per tale motivo abbiamo valutato gli effetti del trattamento con OZOILE nel processo di riparazione dei tessuti nel prepuzio affetto da BXO.

Gli effetti benefici dell'olio ozonizzato nel processo di riparazione tissutale sono stati riportati in precedenza [14,40-42] e possono essere associati alla sua azione antimicrobica, ma anche alla sua capacità di indurre l'attivazione locale di antiossidanti e il rilascio di fattori di crescita.

Le dosi terapeutiche di ozono producono uno stress ossidativo moderato che stimola l'espressione di numerosi enzimi antiossidanti mediante l'attivazione di Nrf2 [43].

La generazione di un ambiente moderato pro-ossidante porta alla stimolazione di meccanismi molecolari in grado di sopprimere la risposta infiammatoria. Inoltre, lo stress ossidativo moderato può indurre l'espressione del fattore inducibile l'ipossia-1α - (HIF-1α) [44], un fattore di trascrizione associato principalmente alle risposte adattative delle cellule all'ipossia [45]. HIF-1α induce l'espressione di centinaia di geni, tra questi diversi fattori di crescita come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), fattore di crescita del fibroblasto (FGF), fattore di crescita trasformante-α (TGF-α) e TGF-β [46] che sono tutti coinvolti nel complesso processo multi-step della rigenerazione tissutale. Il VEGF, uno dei più potenti fattori di crescita proangiogenetica della pelle, contribuisce al ripristino del flusso sanguigno, fornendo in questo modo ossigeno, nutrienti e altri mediatori necessari per supportare la crescita e la funzione delle cellule riparative nei tessuti danneggiati [47].

Durante la riparazione tissutale, l'adesione cellula-cellula mediata dalla caderina contribuisce alla ricostituzione della barriera epiteliale e la caderina-E, una glicoproteina di superficie cellulare appartenente alla famiglia delle caderine, fondamentale per mantenere l'integrità epiteliale [48,49], partecipa anche ai

processi di riepitelizzazione dei tessuti tramite la modulazione della polarità cellulare [50], differenziazione, crescita e migrazione [51]. In precedenza, abbiamo riportato una perdita di E-caderina nel prepuzio dei soggetti affetti da BXO in confronto al tessuto non affetto.

È interessante notare che nel presente studio abbiamo dimostrato che il trattamento OZOILE è in grado di sovraregolare l'espressione di E-caderina e questo effetto è stato associato alla sovraespressione di VEGF e HIF-1 α . Sulla base di queste osservazioni, potremmo ipotizzare che uno stress ossidativo moderato indotto dal trattamento con OZOILE sia in grado di indurre l'up-regolazione di HIF-1 α , che a sua volta può innescare il processo di riepitelizzazione del prepuzio danneggiato dalla BXO stimolando le fasi iniziali di rigenerazione tissutale come la ricostruzione dell'angiogenesi e della membrana basale. Nel nostro studio, abbiamo dimostrato che l'uso topico preoperatorio dell'olio di oliva ozonizzato con vitamina E acetato ha un effetto favorevole sui pazienti sottoposti a circoncisione, inducendo una significativa riduzione dello stato infiammatorio senza reazioni avverse. Inoltre, il trattamento con OZOILE potrebbe stimolare un recupero più rapido e promuovere il processo di guarigione nei bambini o adolescenti sottoposti a circoncisione affetti da BXO, suggerendo anche il possibile uso di OZOILE durante il periodo postoperatorio.

Materiali e metodi

Reclutamento dei pazienti

Sono stati inclusi nello studio trenta bambini con diagnosi istologica di BXO.

L'età media alla diagnosi era di $9,8 \pm 2,8$ anni, con un range tra i 5 ai 15 anni.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame clinico, raccolta dell'anamnesi personale e familiare, ed intervento chirurgico di circoncisione.

Il consenso informato e l'autorizzazione all'utilizzo dei dati sensibili è stato ottenuto dai genitori di tutti i soggetti al momento del ricovero.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico del nostro ospedale e tutte le procedure eseguite sono state conformi agli standard etici del comitato di ricerca e alla dichiarazione di Helsinki del 1964.

La diagnosi di BXO era posta dagli anatomo-patologi, se la cute prepuziale presentava una lesione epiteliale-stromale caratterizzata da atrofia squamosa o iperplasia, bande di infiltrazione linfocitaria, ialinizzazione del derma papillare, ipercheratosi, incontinenza dei pigmenti e / o edema cutaneo.

Prima della circoncisione, quindici pazienti con diagnosi clinica di BXO sono stati trattati con crema OZOILE una volta al giorno per 7 giorni, quindici pazienti pari età, affetti anch'essi da BXO clinica ma non sottoposti ad alcun trattamento farmacologico preoperatorio, sono stati reclutati come gruppo di controllo. Il prepuzio per ogni paziente è stato suddiviso in due metà simmetriche una parte inviata per l'esame istologico l'altra utilizzata per le analisi biochimiche e molecolari.

Sulla cute prepuziale dei pazienti è stata effettuata l'analisi dei trascritti di IL1- β , TNF- α , IL-6, IFN γ , e-caderina, TG1, TG2, e il saggio EMSA per la valutazione dei livelli di NkKb

Analisi dei trascritti genici mediante Real-Time PCR

La tecnica è stata utilizzata per lo studio dei trascritti IL1- β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , e-caderina, TG1, TG2 nei campioni di cute prelevati dai pazienti non trattati e trattati con OZOILE .

L'analisi è stata eseguita nel modo seguente:

- Estrazione dell'RNA totale dalla cute;
- Quantificazione dell'RNA estratto;
- Sintesi del cDNA;
- Amplificazione mediante qReal-Time PCR dei geni in questione;
- Analisi dei risultati con metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Estrazione dell'RNA totale

L'isolamento dell'RNA totale è stato effettuato mediante l'utilizzo del reagente TRIzol, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato.

Durante l'omogenizzazione dei campioni questo reagente mantiene l'integrità dell'RNA, mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari.

L'aggiunta del cloroformio seguita dalla centrifugazione, separa la soluzione in una fase acquosa in cui rimane l'RNA ed una fase organica. Dopo il trasferimento della fase acquosa in una eppendorf RNasi free, l'RNA viene recuperato mediante precipitazione con alcool isopropilico ed ulteriormente purificato con etanolo al 75%.

Dopo centrifugazione, allontanato il surnatante, il pellet viene lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti, risospeso in una soluzione acquosa allo 0,01% di DEPC (dietil-piropirone), sostanza che protegge l'RNA dalla degradazione perché inibisce specificatamente le ribonucleasi, e successivamente incubato per 10 minuti a 60°C.

La quantificazione dell'RNA estratto è stata eseguita leggendo l'assorbanza del campione opportunamente diluito a 260 nm.

Bisogna precisare che durante la lettura è stato importante anche valutare il grado di purezza dell'RNA estratto facendo riferimento alla ratio 260/280, data dal rapporto tra l'assorbanza del campione a 260 nm e quella a 280 nm (lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine). Un valore di tale parametro inferiore a 1,8 è indice della presenza di proteine nel campione, in tal caso l'estrazione dell'RNA è stata ripetuta.

Sapendo che 40 μ g di RNA hanno un'assorbanza a 260 nm (A_{260}) pari a 1, la concentrazione dell'RNA del campione è stata calcolata, utilizzando la formula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} * 40 * \text{fattore di diluizione}$$

Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata effettuata utilizzando l'High-Capacity cDNA Archive Kit, che consente di retrotrascrivere quantità minime di RNA ad una resa superiore rispetto agli altri kit. Infatti, un'aliquota di ciascun campione, contenente 2 μ g di RNA totale, è stata dispensata all'interno di corrispondenti eppendorf, contenenti la miscela di reazione costituita dall'RT buffer (2x), dalla soluzione di dNTP (2x), dai Random

Primer (2x), dall'RNasi OUT (1 U/ml), dalla trascrittasi inversa MultiScribe (5 U/μl) e dalla soluzione acquosa di DEPC (0,01%) aggiunta fino ad ottenere un volume finale di 20μl.

La retro-trascrizione è avvenuta mediante un'incubazione per 10 minuti a 25°C e poi per 2 ore a 35°C nel termociclatore HYBAID PCR sprint.

Real Time-PCR

La Real Time PCR è una tecnica che consente di quantificare in tempo reale in modo accurato, sensibile e riproducibile la presenza di specifiche sequenze geniche.

Essa monitora la fluorescenza emessa durante la reazione come indicatore della produzione degli ampliconi ad ogni ciclo

Il segnale aumenta in modo proporzionale alla quantità dei prodotti di PCR. Monitorando la quantità di emissione fluorescente ad ogni ciclo, è possibile valutare la PCR durante la fase esponenziale dove il primo incremento significativo correla con la quantità iniziale del target. Quanto più alto è il numero di copie iniziale del target, tanto più precocemente si ha un aumento significativo della fluorescenza osservata.

Per questo studio, l'analisi quantitativa è stata realizzata utilizzando un agente DNA-intercalante, il SYBR Green (SYBR Green Master Mix).

L'amplificazione con Sybr Green è stata utilizzata per l'analisi dei trascritti di TGasi 1, TGasi2, TGasi3, IL1-β, TNF-α, IFN-γ, NOS2, HIF-1α, VEGF, e β-actina. Per questa metodica, il cDNA sintetizzato (40 ng, in doppio per ogni campione) è stato amplificato in una miscela contenente 5μl Sybr Green Master mix, 0.2 μM di primer senso e anti-senso specifici per ciascun target genico e H₂O fino ad un volume totale di 10 μl. Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate in tabella 1.

L'amplificazione è stata eseguita all'interno dell'apparecchio Applied BioSystem 7900 HT nelle seguenti condizioni: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti, un altro ciclo successivo di 10 minuti a 95 °C seguiti da 50 cicli costituiti da una fase di 15 secondi a 95 °C e un'altra di 1 minuto a 60°C.

Nella Real-Time PCR con Sybr Green, per verificare che i prodotti ottenuti non fossero dovuti ad amplificazione aspecifica o a dimeri di primer, che potrebbero compromettere la quantificazione del prodotto amplificato, al termine dell'amplificazione è stata eseguita la curva di dissociazione (Melting Curve), che permette di individuare la temperatura di fusione (T_m) specifica per ogni amplificato esaminato. Come ulteriore controllo, i campioni sono analizzati su gel d'agarosio al 2% dopo corsa elettroforetica.

Alla fine della reazione i risultati sono stati raccolti usando il programma SDS 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) ed analizzati mediante il software RQ manager con metodo della quantificazione relativa 2-ΔΔCt.

Tabella 1. Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per lo studio dell'espressione genica in Real-Time PCR.

Gene	Primer	Sequenza primer 5'→ 3'
ACT-β	senso	TGGTTACAGGAAGTCCCTTGCC
ACT-β	anti- senso	ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG
IL1-β	senso	GCTTATTACAGTGGCAATGA
IL1-β	anti- senso	TAGTGGTGGTCGGAGATT
TNF-α	senso	GTGAGGAGGACGAACATC
TNF-α	anti-senso	GAGCCAGAAGAGGTTGAG
IFN-γ	senso	GCAGCCAACCTAAGCAAGAT
IFN-γ	anti-senso	TCACCTGACACATTCAAGTTCTG
TG1	senso	GATTGTCTTCAAGAACCCCTTCCC
TG1	anti-senso	TCATCTGACTCCAGTCCCATTGCTC
TG2	senso	CCTTACGGAGTCCAACCTCA
TG2	anti-senso	CCGTCTTCTGCTCCTCAGTC
IL-6	senso	TGAGAGTAGTGAGGAACAA
IL-6	anti-senso	CGCAGAATGAGATGAGTT
IL1-β	senso	GCTTATTACAGTGGCAATGA
IL1-β	anti- senso	TAGTGGTGGTCGGAGATT
TNF-α	senso	GTGAGGAGGACGAACATC
TNF-α	anti-senso	GAGCCAGAAGAGGTTGAG
E-caderina	senso	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC
E-caderina	Anti-senso	CAGTATCAGCCGCTTTCAGATTTT

La presenza di attività di legame del DNA NF-KB negli estratti nucleari è stata valutata attraverso saggio 'EMSA come descritto da Caccamo et al. [52].

Per preparare gli estratti nucleari, dopo che le cellule di trattamento sono state omogeneizzate in tampone di lisi ipotonica ghiacciato (10 mM HEPES, pH 7,9, EGM 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, ditiotreitolo 0,1 mM, fluoruro di sodio 50 mM, ortovanadato di sodio 1 mM, 30 mM β -glicerofosfato, 20 mM p-nitrofenilfosfato, 0,5 mM fenilmetilsolfonil fluoruro, 1% NP-40 e 10 µg / mL leupeptin, leupeptin e pepstatin)

. I campioni sono stati incapsulati per 20 minuti e diluiti al calore a 2000 giri / minuto rpm per 2 minuti a 4°C, effettuata per far precipitare le membrane. Trasferimento del surnatante in nuove eppendorf e

risospensione del pellet nucleare in un tampone di estrazione nucleare ipertonico contenente 20 mM di HEPES a pH 7.9, 420 mM di NaCl, 1 mM di EDTA, 1 mM di DTT, 50 mM di sodio fluoruro, 1 mM di sodio ortovanadato, 30 mM di b-glicerofosfato, 20 mM di p-nitrofenil fosfato, 0,5 mM di fenil metil sulfonil fluoruro e 10 µg/ml di aprotinina, leupeptina e pepstatina), incubati in ghiaccio per 30 minuti con Vortex intermittente e centrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti a 4 ° C. Il surnatante è stato raccolto come estratto nucleare e la concentrazione di proteine è stata determinata dal saggio Bradford.

Analisi Statistica

I dati ottenuti dagli esperimenti descritti sono stati espressi come valori medi \pm errore standard della media (SEM) e analizzati attraverso il test t di Student, o l'Anova ad una via ove opportuno, usando il software GraphPad Prism v5. L'analisi di correlazione di Pearson è stata utilizzata per descrivere il rapporto tra i livelli Tg2 e IFN-mRNA.

Acknowledgments: This study was carried out with departmental funding only.

Author Contributions: C.R. and R.I. conceived the study; D.C. and P.I. designed the experiments; M.C. and N.F. performed the experiments; P.P., S.P. and T.R. collected the samples and clinical data; P.A. and S.A. analyzed the data; M.C. and T.R. wrote the manuscript; D.C. and P.I. provided suggestion and revised the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kiss, A.; Király, L.; Kutasy, B.; Merksz, M. High incidence of balanitis xerotica obliterans in boys with phimosis: Prospective 10-year study. *Pediatr. Dermatol.* **2005**, *22*, 305–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Christman, M.S.; Chen, J.T.; Holmes, N.M. Obstructive complications of lichen sclerosus. *J. Pediatr. Urol.* **2009**, *5*, 165–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Stuhmer, A. Balanitis xerotica obliterans (post-operationem) und ihre Beziehungen zur “Kraurosis glandis et praeputii penis”. *Arch. Dermatol. Syph.* **1928**, *156*, 613–623. [[CrossRef](#)]
4. Becker, K.; Meissner, V.; Farwick, W.; Bauer, R.; Gaiser, M.R. Lichen sclerosus and atopy in boys: Coincidence or correlation? *Br. J. Dermatol.* **2013**, *168*, 362–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Celis, S.; Reed, F.; Murphy, F.; Adams, S.; Gillick, J.; Abdelhafeez, A.H.; Lopez, P.J. Balanitis xerotica obliterans in children and adolescents: A literature review and clinical series. *J. Pediatr. Urol.* **2014**, *10*, 34–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tong, L.X.; Sun, G.S.; Teng, J.M. Pediatric Lichen Sclerosus: A Review of the Epidemiology and Treatment Options. *Pediatr. Dermatol.* **2015**, *32*, 593–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Neill, S.M.; Lewis, F.M.; Tatnall, F.M.; Cox, N.H. British Association of Dermatologists. British Association of Dermatologists’ guidelines for the management of lichen sclerosus 2010. *Br. J. Dermatol.* **2010**, *163*, 672–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chi, C.C.; Kirtschig, G.; Baldo, M.; Lewis, F.; Wang, S.H.; Wojnarowska, F. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on topical interventions for genital lichen sclerosus. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *67*, 305–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Narahari, R.; O’Riordan, A.; N’Dow, J.M.; Pickard, R. *Simple Dilatation, Endoscopic Urethrotomy, and Urethroplasty for Urethral Stricture in Adults*; Cochrane Database: New York, NY, USA, 2008.
10. Goldstein, A.T.; Creasey, A.; Pfau, R.; Phillips, D.; Burrows, L.J. A double-blind, randomized controlled trial of clobetasol versus pimecrolimus in patients with vulvar lichen sclerosus. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2011**, *64*, 99–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Valacchi, G.; Fortino, V.; Bocci, V. The dual action of ozone on the skin. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *153*, 1096–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Travagli, V.; Zanardi, I.; Bocci, V. Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: An insight into the patent claims. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.* **2009**, *4*, 130–142. [[CrossRef](#)]
13. Lamberto, R.; Mawsouf, M.N.; Menéndez, S.; Olga, S.; León Sánchez, G.M.; Hernández, F. Ozone therapy: Clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch. Med. Res.* **2008**, *39*, 17–26.
14. Travagli, V.; Zanardi, I.; Valacchi, G.; Bocci, V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. *Med. Inflamm.* **2010**, *6*, 10–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cronheim, G. Organic ozonides as chemotherapeutic agents. II. Antiseptic properties. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1947**, *36*, 278–281. [[CrossRef](#)]
16. Tara, F.; Zand-Kargar, Z.; Rajabi, O.; Berenji, F.; Akhlaghi, F.; Shakeri, M.T.; Azizi, H. The Effects of Ozonated Olive Oil and Clotrimazole Cream for Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Altern. Ther. Health Med.* **2016**, *22*, 44–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Patel, P.V.; Kumar, V.; Kumar, S.; Patel, G.D. Therapeutic Effect of Topical Ozonated Oil on Epithelial Healing of Palatal Wound Site: A Planimetric and Cytological Study. *J. Investig. Clin. Dent.* **2011**, *2*, 248–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Patel, P.V.; Patel, A.; Kumar, S.; Holmes, J.C. Effect of subgingival application of topical ozonated olive oil in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, controlled, double blind, clinical and microbiological study. *Minerva Stomatol.* **2012**, *61*, 381–398. [[PubMed](#)]

19. Berger, M.B.; Damico, N.J.; Menees, S.B.; Fenner, D.E.; Haefner, H.K. Rates of self-reported urinary, gastrointestinal, and pain comorbidities in women with vulvar lichen sclerosus. *J. Low. Genit. Tract Dis.* **2012**, *16*, 285–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Karadag, A.S.; Kavala, M.; Ozlu, E.; Zindanc, İ.; Ozkanl, S.; Turkoglu, Z.; Zemheri, E. The co-occurrence of lichen sclerosus et atrophicus and celiac disease. *Indian Dermatol. Online J.* **2014**, *5*, S106–S108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jacobs, L.; Gilliam, A.; Khavari, N.; Bass, D. Association between lichen sclerosus and celiac disease: A report of three pediatric cases. *Pediatr. Dermatol.* **2014**, *31*, e128–e131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Oyama, N.; Chan, I.; Neill, S.; Hamada, T. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Lancet* **2003**, *362*, 118–123. [[CrossRef](#)]
23. Edmonds, E.; Barton, G.; Buisson, S.; Francis, N.; Gotch, F.; Game, L.; Haddad, M.; Dinneen, M.; Bunker, C. Gene expression profiling in male genital lichen sclerosus. *Int. J. Exp. Pathol.* **2011**, *92*, 320–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kantere, D.; Löwhagen, G.B.; Alvengren, G.; Månesköld, A.; Gillstedt, M.; Tunbäck, P. The clinical spectrum of lichen sclerosus in male patients—A retrospective study. *Acta Derm. Venereol.* **2014**, *94*, 542–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pilatz, A.; Altinkilic, B.; Schormann, E.; Maegel, L.; Izykowski, N.; Becker, J.; Weidner, W.; Kreipe, H.; Jonigk, D. Congenital phimosis in patients with and without lichen sclerosus: Distinct expression patterns of tissue remodeling associated genes. *J. Urol.* **2013**, *189*, 268–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Russo, T.; Currò, M.; Barbera, A.; Caccamo, D.; Antonuccio, P.; Arena, S.; Montalto, A.S.; Parisi, S.; Marseglia, L.; Gitto, E.; et al. Expression of transglutaminase in foreskin of children with Balanitis Xerotica Obliterans. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kiss, A.; Csontai, A.; Pirot, L.; Nyrdy, P.; Merksz, M.; Kiraly, L. The response of balanitis xerotica obliterans to local steroid application compared with placebo in children. *J. Urol.* **2001**, *165*, 219–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dahlman-Ghozlan, K.; Hedblad, M.A.; Von Krogh, G. Penile lichen sclerosus et atrophicus treated with Clobetasol dipropionate 0.05% cream: A retrospective clinical and histopathological study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1999**, *40*, 451–457. [[CrossRef](#)]
29. Bracco, G.L.; Carli, P.; Sonni, L.; Maestrini, G.; De Marco, A.; Taddei, G.L. Clinical and histologic effects of topical treatments of vulval lichen sclerosus. A critical evaluation. *J. Reprod. Med.* **1993**, *38*, 37–40. [[PubMed](#)]
30. Poindexter, G.; Morrell, D.S. Anogenital pruritus: Lichen sclerosus in children. *Pediatr. Ann.* **2007**, *36*, 785–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Patel, P.V.; Kumar, S.; Vidya, G.D.; Patel, A.; Holmes, J.C.; Kumar, V. Cytological Assessment of Healing Palatal Donor Site wound and Grafted Gingival Wound after Application of Ozonated Oil: An Eighteen Months Randomized Controlled Clinical Trial. *Acta Cytol.* **2012**, *56*, 277–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sechi, L.A.; Lezcano, I.; Nunez, N.; Espim, M.; Duprè, I.; Pinna, A.; Mollicotti, P.; Fadda, G.; Zanetti, S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 279–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Quan, G.; Choi, J.Y.; Lee, D.S.; Lee, S.C. TGF- β 1 upregulates transglutaminase 2 and fibronectin in dermal fibroblasts: A possible mechanism for the stabilization of tissue inflammation. *Arch. Dermatol. Res.* **2005**, *297*, 84–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Johnson, K.; Hashimoto, S.; Lotz, M.; Pritzker, K.; Terkeltaub, R. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 149–163. [[CrossRef](#)]
35. Chen, D.; Bassi, J.K.; Walther, T.; Thomas, W.G.; Allen, A.M. Expression of angiotensin type 1A receptors in C1 neurons restores the sympathoexcitation to angiotensin in the rostral ventrolateral medulla of angiotensin type 1A knockout mice. *Hypertension* **2010**, *56*, 143–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Crowley, S.D.; Vasievich, M.P.; Ruiz, P.; Gould, S.K.; Parsons, K.K.; Pazmino, A.K.; Facemire, C.; Chen, B.J.; Kim, H.S.; Tran, T.T.; et al. Glomerular type 1 angiotensin receptors augment kidney injury and inflammation in murine autoimmune nephritis. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 943–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Green, S.J.; Nancy, C.A.; Meltzer, M.S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: A protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **1991**, *50*, 93–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kim, S.Y. Molecular design and biological activities of NF- κ B inhibitors. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 3026–3035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Feldmann, M.; Brennan, F.M.; Maini, R.N. *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy, Role of Cytokines in Autoimmune Diseases*; Blackwell Science: Boston, MA, USA, 1995; pp. 185–194.
40. Kim, H.S.; Noh, S.U.; Han, Y.W. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J. Korean Med. Sci.* **2009**, *24*, 368–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Papanas, N.; Maltezos, E. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: New technologies, any promises? *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2007**, *6*, 37–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Valacchi, G.; Lim, Y.; Zanardi, I.; Bocci, V.; Travagli, V. Evaluation of ozonated sesame oil effect in wound healing using the SKH1 mice as a model. In Proceedings of the 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta, Malta, 8–11 March 2010.
43. Sagai, M.; Bocci, V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med. Gas Res.* **2011**, *1*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Amina, A.; Aleksander, Q.; Popel, S. Reactive Oxygen Species Regulate Hypoxia-Inducible Factor 1 α Differentially in Cancer and Ischemia. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5106–5119.
45. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Murdoch, C.; Muthana, M.; Lewis, C.E. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 6257–6263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Johnson, K.E.; Wilgus, T.A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv. Wound Care* **2014**, *3*, 647–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bamji, S.X.; Rico, B.; Kimes, N.; Reichardt, L.F. BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin- β -catenin interactions. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 289–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Barker, N.; van de Wetering, M.; Clevers, H. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1856–1864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Baumeister, U.; Funke, R.; Ebnet, K.; Vorschmitt, H.; Koch, S.; Vestweber, D. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1686–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Baumgartner, W.; Hinterdorfer, P.; Ness, W.; Raab, A.; Vestweber, D.; Schindler, H.; Drenckhahn, D. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4005–4010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Caccamo, D.; Campisi, A.; Currò, M.; Aguenouz, M.; Li Volti, G.; Avola, R.; Ientile, R. Nuclear factor κ b activation is associated with glutamate evoked tissue transglutaminase up-regulation in primary astrocyte cultures. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *82*, 858–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compound (OZOILE) are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).